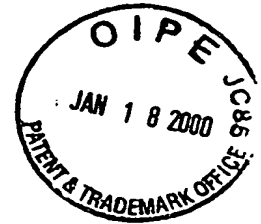


日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 8 年 1 0 月 2 0 日

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 2 9 8 8 9 6 号

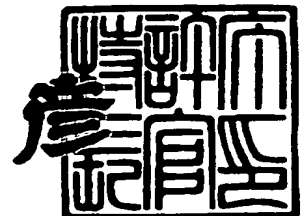
出 願 人
Applicant (s):

松下電器産業株式会社

1 9 9 9 年 1 0 月 2 2 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 7 2 9 8 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 2030100069

【提出日】 平成10年10月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/30

【発明の名称】 試料液の処理器具、およびこれを用いた試料液の処理方法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 宮下 万里子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 吉岡 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 南海 史朗

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062926

【弁理士】

【氏名又は名称】 東島 隆治

【選任した代理人】

【識別番号】 100072431

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 和郎

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 031691

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9301762

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 試料液の処理器具、およびこれを用いた試料液の処理方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 バイオセンサに供給する被分析試料液を調製する器具であって、前記試料液をバイオセンサによる分析に適した状態に調製する制御手段を具備することを特徴とする試料液の処理器具。

【請求項 2】 前記制御手段が、前記器具の内側に配された触媒を有し、前記触媒が、前記試料液に含まれる妨害物質を分析結果に影響を与えない物質に変化させる触媒である請求項 1 記載の試料液の処理器具。

【請求項 3】 前記制御手段が、前記器具の内側に配された吸着剤を有し、前記吸着剤が、前記試料液に含まれる妨害物質を物理的に吸着して除去する吸着剤である請求項 1 記載の試料液の処理器具。

【請求項 4】 前記制御手段が、前記器具の内側に配された pH 緩衝剤を有し、前記緩衝剤が、前記試料液をバイオセンサに含まれる酵素の活性に適した pH に調製する緩衝剤である請求項 1 記載の試料液の処理器具。

【請求項 5】 さらに、試料液を加熱する手段を具備する請求項 1～4 のいずれかに記載の試料液の処理器具。

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれかに記載の試料液の処理器具に、バイオセンサに供給する被分析試料液を導入して、前記被分析試料液をバイオセンサによる分析に適した状態に近づける工程を含むことを特徴とする試料液の処理方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオセンサに供給する被分析試料液を処理する器具とこれを用いた試料液の処理方法に関する。

【0002】

【従来技術】

試料液中の特定成分を簡易に定量する方法として、特定成分とこの特定成分を

基質とする酸化還元酵素とを電子受容体の存在下で反応させ、還元された電子受容体を電気化学的に酸化して得られる酸化電流値より求める方法がある。

この方法を利用したバイセンサは、測定対象物を基質とする酸化還元酵素を選択することによって、種々な物質に対する測定が原理的には可能である。

このようなバイオセンサは、酵素反応や電極反応を利用して分析をおこなうため、分析精度を向上させるには、酵素反応や電極反応などが円滑に行われるようにする必要がある。

そのため、試料液の温度や pH を調製して酵素活性を高めたり、酵素反応や、電極反応を阻害する物質を除去したりすることが検討されている。

また、試料液中には、酸化されやすい易酸化性物質が含まれる場合がある。易酸化性物質は、電子受容体を酸化するとき同時に酸化されて酸化電流を生じ、測定結果に正の誤差を与えるため、測定精度が低下する原因となる。そのため、この易酸化性物質の影響を抑制する必要がある。

【0003】

従来、上記のような課題を解決するための手段は、バイオセンサの測定系内に組み込まれている。

例として、固定化酵素膜と電極反応を用いたバイオセンサであるフローインジェクション分析装置 (Yellow Spring Instrument Co., Inc. 製 YSI MODEL2700 SELECT) の測定動作を挙げて説明する。

この分析装置の測定系は、少なくとも作用極と対極を含む電極系、この電極系に装着された固定化酵素膜、被分析試料液が供給されて測定場となるサンプルチャンバー、および前記電極系と接続された電気回路系から構成されている。

【0004】

まず、他方がサンプルチャンバーに連通するサンプル吸引用のチューブを試料液に浸し、試料液をサンプルチャンバーに吸引して、試料液をサンプルチャンバーへ供給する。このとき、一定量の緩衝液も別の吸引チューブを通じてサンプルチャンバー内に供給する。

続いて、サンプルチャンバー内に設置されたスターラーによって、供給された試料液と緩衝液を攪拌混合する。そして、試料液と緩衝液が導入されて一定時間

が経過した後、電気化学的な測定を行うことによって、試料液中の測定対象物の定量を行う。

【0005】

このような構成の分析装置は、緩衝液がサンプルチャンバーに導入されることによって、試料液を適当な濃度に希釈すると同時に、試料液を酵素反応に適するpHに調製することができる。

また、試料液と緩衝剤を攪拌することによって、試料液と緩衝液の混合が迅速に行えると同時に、酸素が溶液中に溶解するのを促進し、酵素反応が進行するのに十分な酸素を供給することができる。

【0006】

しかし、このような分析装置は、測定対象物が変わると、それに合わせて固定化酵素膜を交換しなければならない。また、酵素によって、酵素反応に適したpH域が異なるため、緩衝液も同時に交換しなければならない。そのため、操作が煩雑になるという問題があった。

また、希釈によって、酵素反応や電極反応を阻害する妨害物質や、易酸化性妨害物質による影響を低減することはできるが、影響を除去することは困難であるため、分析精度を向上させるには限界があった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題を鑑み、バイオセンサに供給する被分析試料液を、高精度に、かつ迅速に分析できる状態に、簡便に調製する処理工具を提供することを目的とする。

また、上記器具を用いて、バイオセンサに供給する被分析試料を処理する方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明の試料液の処理工具は、バイオセンサに供給する被分析試料液を、バイオセンサによる分析に適した状態に近づける制御手段を具備することを特徴とする。

また、本発明による試料液の処理方法は、上記の試料液の処理器具に、バイオセンサに供給する被分析試料液を供給する工程を含むことを特徴とする。

【0009】

【発明の実施の形態】

上記のように、本発明の試料液の処理器具は、被分析試料液をバイオセンサによる分析に適した状態に制御する手段を具備するもので、この処理器具を用いて試料液をあらかじめ調製することによって、特定成分を高精度、かつ迅速に分析することができる。

ここにおいて、前記制御手段が、前記妨害物質を分析結果に影響を与えない物質に変化させる反応を触媒する物質を有すると、妨害物質の影響を除去できる。

例えば、試料液に易酸化性妨害物質が含まれる場合、易酸化性妨害物質が酸化するのを触媒する酵素や、二酸化マンガンなどの金属酸化物等を含む触媒層を処理器具に備えると、この処理器具に試料液を供給したとき、易酸化性妨害物質が酸化されて、酸化電流値を生じることのない物質に変化させることができるため、バイオセンサの測定精度を向上させることができる。

このような易酸化性妨害物質としては、アスコルビン酸や尿酸などがある。アスコルビン酸が含まれる場合は、触媒層にアスコルビン酸オキシダーゼを含ませると、アスコルビン酸を酸化されにくいデヒドロアスコルビン酸に変化させることができる。

また、触媒層には、バイオセンサに含まれる酵素が、測定対象物と誤って反応してしまう物質を、酵素が反応しないような物質に変化させる触媒を含ませてもよい。

【0010】

また、前記制御手段が、物理吸着能を有する吸着剤を有すると、試料液中に含まれる妨害物質を試料液中から取り除くことができる。

例えば、醸造食品の醸造過程で生じる乳酸などの有機酸は、酵素反応や電極反応に悪影響を与えるため、醸造食品の品質管理のためのグルコース濃度の測定精度を低下させる。

そこで、活性炭を含む層で吸着層を構成した処理器具で試料液を処理して、有

機酸を除去すると、分析精度を向上させることができる。

【0011】

さらに、前記制御手段が、試料液が処理工具に供給されると同時に試料液中に溶解して、試料液を使用する酵素の活性に適した pH 域にすることができる緩衝剤を有すると、バイオセンサに含まれる酵素の活性を向上させることができ、高精度で、迅速に分析を行える。

例えば、酵素が乳酸オキシダーゼの場合、その活性に適した pH 域は 6～7 であるので、このような pH 域に試料液を調製するため、リン酸緩衝液のような pH 緩衝剤を用いるのがよい。その他、使用する酵素に応じて、McIlvaine 緩衝剤、Tris-HCl 緩衝剤などの pH 緩衝剤が用いられる。

【0012】

処理工具の材質は、樹脂などが適しているが、上記のような制御手段を具備させることが可能であれば、それに限定されることはない。

また、処理工具は、上記の制御手段を包含することが可能であり、かつ試料液を保持することが可能であれば、その形状を問わない。

さらに、上記の制御手段を配する位置は、処理工具に試料液を供給した際に、試料液と接触可能な位置であれば、任意の場所でよい。

【0013】

前記処理工具が、加熱手段を具備すると、冷蔵庫など低温の保存庫から出してから時間が経過していない試料液でも、すぐにバイオセンサに供給して測定することが可能となる。また、酵素に限らず、一般に触媒は最も触媒能が高まる温度があるため、試料液をその温度に調節することが可能であれば、試料液の処理や、分析を迅速に完了させることが可能となって好適である。

加熱手段としては、ヒータ線を織込んだ織物などの電熱シートなどで処理工具を被覆するのがよい。

また、前記処理工具が、攪拌手段を具備すると、試料液と触媒層や pH 緩衝剤層を均一に混合することができてよい。

【0014】

本発明の試料液の処理方法は、上記のような試料液の処理工具に、試料液を供

給して、試料液をバイオセンサによる分析に適した状態に近づくように調製する工程を含む。

このような構成をとることによって、バイオセンサに試料液を導入してから、希釈などの妨害物質の影響を削減するための煩雑な操作を省略することができる。

また、バイオセンサは、試料液中に含まれる分析対象物の濃度が高くなるにつれて、分析精度が低下する傾向がある。そのため、試料液に水や緩衝液等を供給して、試料液を適当な倍率に希釈すると、測定精度が向上する。

このとき、希釈液に、試料液をバイオセンサに含ませた酵素の活性に適した pH 域に調製できる緩衝液を利用するとよい。

さらに、試料液を攪拌したり、加熱したりすると、試料液の処理が迅速に行われる。

【0015】

【実施例】

以下に、具体的な実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。

図 1 は本発明の一実施例における試料液の処理工具の外観を示す斜視図である。図 2 は、図 1 の縦断面図である。

樹脂製の容器 10 の底面に、試料液を所望の状態に調製する手段となる物質を直接圧着させる、または前記物質を適当な溶媒に溶解させた溶液、もしくは適当な分散媒に分散させた分散液を滴下し、乾燥させて、溶媒や分散媒を揮発させ、制御膜 11 を形成している。

図 3 は、本発明の他の実施例における試料液の処理工具の縦断面図である。樹脂製の容器 20 の内側面に、図 2 と同様にして制御膜 21 を作成している。

【0016】

図 4 は、本発明の一実施例に用いたバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板 1 上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード 2、3 を形成している。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板 1 上に印刷して作用極 4 を形成している。

。この作用極 4 は、リード 2 と接触している。さらに、この基板 1 上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層 6 を形成している。絶縁層 6 は、作用極 4 の外周部を覆っており、これにより作用極 4 の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード 3 と接触するように基板 1 上に印刷してリング状の対極 5 を形成している。

図 5 は、本発明の一実施例に用いたバイオセンサの縦断面図である。基板 1 状に、図 4 と同様にして電極系を形成し、この電極系上に、酵素および電子受容体を含む反応層 7 を形成している。

【0017】

《実施例 1》

試料液として、果汁を用意し、この果汁中に含まれるグルコースの濃度を図 5 に示すバイオセンサを用いて測定した。バイオセンサの反応層 7 には、酵素として、グルコース酸化酵素（以下、GOx という。）、電子受容体として、フェリシアン化カリウムを含ませた。

果汁には、易酸化性物質であるアスコルビン酸が多く含まれるため、このままでは、得られる酸化電流値が正の誤差を含み、実際の値よりも高くなる。

そのため、果汁をバイオセンサに導入する前に、次のようにして作製した処理器具によって調製した。

処理器具は、図 2 の樹脂容器 10 の底面に、触媒として、アスコルビン酸が選択的に酸化される反応を触媒するアスコルビン酸オキシダーゼ（以下、AsOx という。）の水溶液を滴下し、乾燥雰囲気下で乾燥して、AsOx 層 11 を形成して作製した。

この処理器具内に、果実の果汁を供給した。果汁に含まれるアスコルビン酸は、AsOx の触媒作用によって、酸化電流値を測定する際、悪影響を及ぼさない物質（デヒドロアスコルビン酸）に変化した。

【0018】

このようにして調製した果汁を上記のバイオセンサに導入した。バイオセンサの反応層 7 上に試料液を滴下すると、反応層 7 が溶解し、反応層 7 内の GOx によって、果汁中のグルコースが選択的に酸化される。この酵素反応に伴い、フェ

リシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

果汁を滴下してから一定時間後に、対極 5 を基準にして、作用極 4 に電圧を印加して、フェロシアン化カリウムをフェリシアン化カリウムに酸化し、このとき流れる電流値を測定した。

その結果、アスコルビン酸を含まないグルコース標準液を測定したときと同程度の精度で、グルコース濃度を測定することができた。

【0019】

また、グルコース濃度が高い果汁を測定する場合、処理器具内に果汁を供給すると同時に水を加えて、果汁を希釈した。その結果、希釈した試料液の方が精度よく定量することができた。

希釈液として、水の代わりに、pH 4～8 に調製された緩衝液を用いて、AsOx の活性に適した pH 域に果汁を調製すると、さらに分析精度が向上した。

また、処理器具内に試料液を供給した後、試料液を攪拌した。その結果、AsOx 層の溶解が早まり、また試料液中への酸素の供給が十分に行えたので、AsOx による触媒反応が促進され、試料液を迅速に処理することができた。

【0020】

次に、図 2 の容器をメッシュ状電熱シートで覆った処理器具に、冷蔵庫から出して時間が経過していない果汁を供給して、暖めたところ、果汁を AsOx の活性に適した温度にできたため、迅速な処理ができた。また、このまま、この調製した果汁を上記と同様にしてバイオセンサに供給して分析したところ、迅速、かつ高精度に分析できた。

【0021】

《実施例 2》

日本酒やワインなどの醸造酒の醸造過程で重要なグルコース濃度の管理を実施例 1 で用いたのと同様のバイオセンサで行った。

日本酒やワインの醗酵過程では、エタノールの他に乳酸やリンゴ酸などの多くの有機酸も生成される。これらの有機酸には、バイオセンサの酵素反応および電極反応に影響を与えるものがある。

そのため、試料液をバイオセンサに導入する前に、次のようにして作製した処

理器具によって、試料液を調製した。

処理器具は、図3の容器20の側面に、適当な割合でテフロンを混合した活性炭をプレスによって圧着し、活性炭層21を形成して作製した。

この処理器具内に、日本酒の醪やワインの醗酵液を供給し、醪や醗酵液に含まれている有機酸を活性炭層の物理吸着作用で除去した。

このようにして調製した試料液を実施例1と同様にして測定したところ、精度よく測定できた。

【0022】

また、醪や醗酵液は、pH3～4程度の低い値になることが多い。そこで、処理器具に醪や醗酵液を処理器具に供給するとき同時に、GOxが好適な活性を示すpH域（pH4～7）に調製された緩衝液を供給して、pHをGOxの活性に適した状態に調製したところ、分析精度が向上した。

【0023】

《実施例3》

乳酸菌醗酵を行っている培地を試料液とし、培地中のL-乳酸の濃度を図5に示すバイオセンサを用いて測定した。ただし、酵素としてL-乳酸酸化酵素（以下、LOxという。）、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを用いた。

乳酸菌醗酵は、醗酵が進行するにつれてL-乳酸が生成されるため、培地が酸性に移行する。バイオセンサに用いる酵素のLOxは、pHが7以下になると急激に活性が低下するため、醗酵が進んだ培地をバイオセンサで測定すると、その測定精度が著しく低下する。

そこで、次のような処理器具を作製し、これを用いて試料液を処理することによって、試料液のpHを調製した。

処理器具は、リン酸水素二カリウムをトルエンに分散させた分散液を図2の容器10の底面に滴下し、そのままトルエンを揮発させて、制御膜11を形成して作製した。

【0024】

この処理器具内に、乳酸菌醗酵の培地を供給し、培地のpHが7になるように調製した。

この調製済みの培地を上記のバイオセンサに導入した。バイオセンサの反応層 7 上に前記の培地を滴下すると、反応層 7 が溶解し、反応層 7 内の LOx によって、培地中の L -乳酸が選択的に酸化される。この酵素反応に伴い、フェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。そして、実施例 1 と同様にして、フェロシアン化カリウムを電気化学的に酸化し、酸化電流値を測定し、培地中の L -乳酸の濃度を求めた。その結果、精度よく測定することができた。

【0025】

【発明の効果】

上記のように、本発明によると、迅速にかつ簡便に、バイオセンサに供給する被分析試料液の状態を調製することができ、バイオセンサを用いた分析の精度を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例における試料液の処理工具の外観を示す斜視図である。

【図 2】

同処理工具の縦断面図である。

【図 3】

本発明の多の実施例における試料液の処理工具の縦断面図である。

【図 4】

本発明の一実施例に用いたバイオセンサの反応層を除いた概略平面図である。

【図 5】

同バイオセンサの縦断面図である。

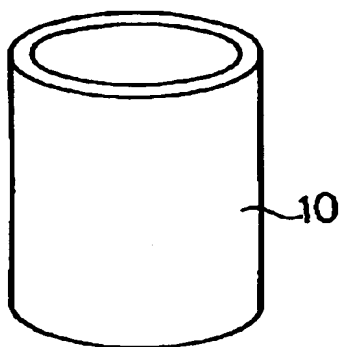
【符号の説明】

- 1 電気絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 反応層

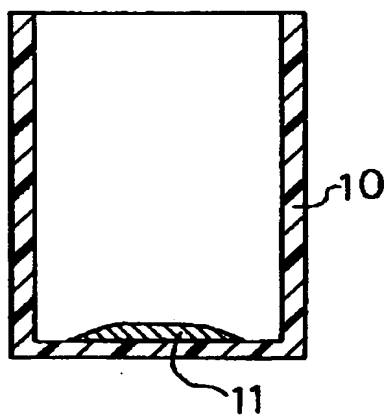
10、20 容器
11、21 制御膜

【書類名】図面

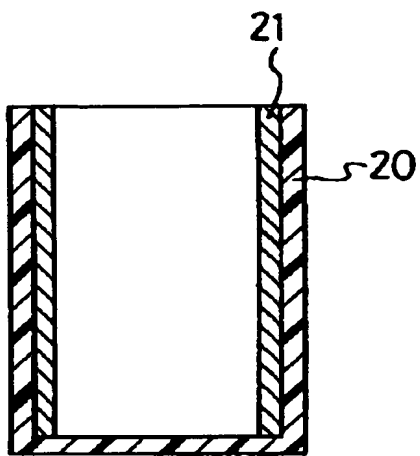
【図 1】



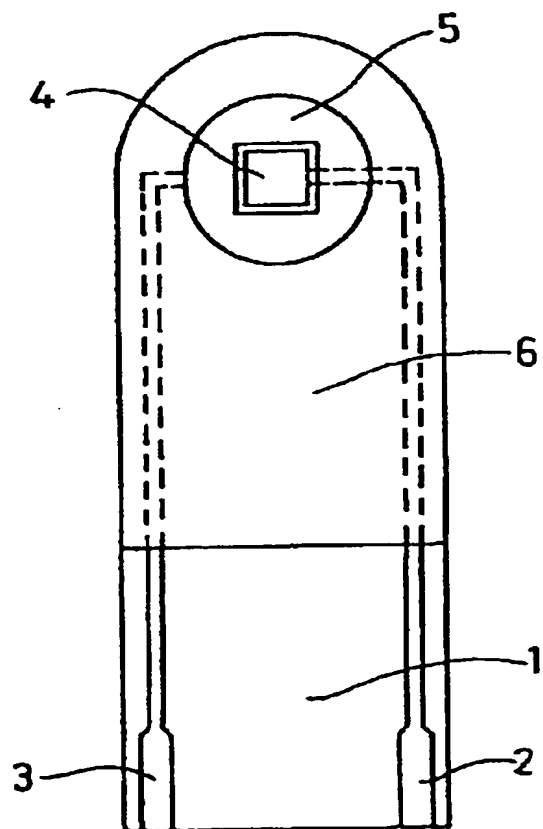
【図 2】



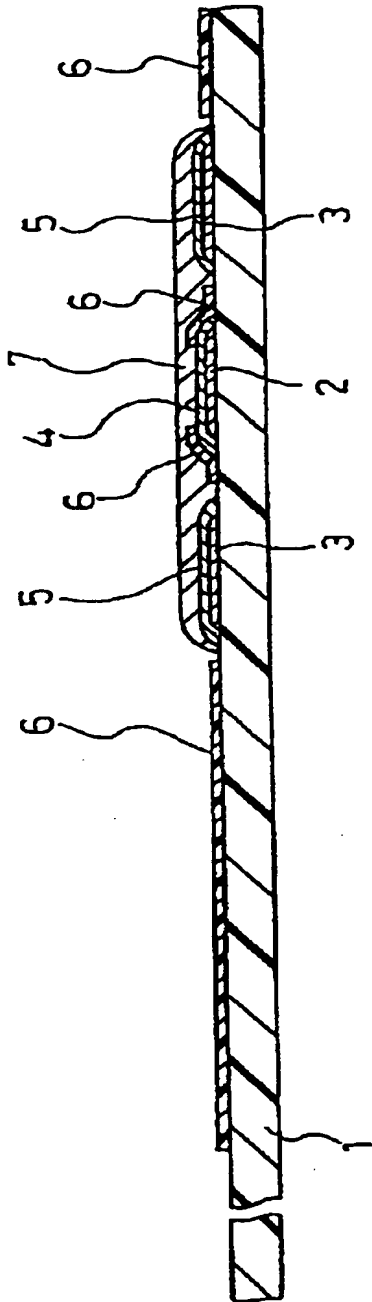
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バイオセンサに供給する被分析試料液を、高精度で、迅速に分析できる状態に調整する試料液の処理工具を提供する。

【解決手段】 本発明の試料液の処理工具は、前記試料液をバイオセンサによる分析に適した状態に調製する制御手段、例えば、妨害物質を除去する触媒や、吸着剤を具備する。

【選択図】 図2

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000005821
【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1006 番地
【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100062926
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区梅田 3 丁目 2 番 14 号 大弘ビル
東島・石井特許事務所
【氏名又は名称】 東島 隆治
【選任した代理人】
【識別番号】 100072431
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区梅田 3 丁目 2 番 14 号 大弘ビル
東島・石井特許事務所
【氏名又は名称】 石井 和郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社